Kulturversuche mit Einsporstämmen und zytologische Untersuchungen in der Gattung *Ceratostomella.*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Gertrud Mittmann

aus Offenau O.-A. Neckarsulm

Mit 45 Textfiguren.

Leipzig

Verlag von Gebrüder Borntraeger

1932

Kulturversuche mit Einsporstämmen und zytologische Untersuchungen in der Gattung *Ceratostomella.*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Gertrud Mittmann

aus Offenau O.-A. Neckarsulm

Mit 45 Textfiguren.

Leipzig

Verlag von Gebrüder Borntraeger

1932

Dekan: Prof. Dr. F. Machatschki

Referent: Prof. Dr. Ernst Lehmann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. März 1933.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Druck von E. Buchbinder (H. Duske) G. m. b. H. in Neuruppin

Einleitung.

Die bisherigen Versuche, die sexuellen Vorgänge bei der Perithezienbildung der Pyrenomyzeten zu klären, haben äußerst verschiedenes Verhalten der einzelnen Vertreter dieser Pilzgruppe aufgedeckt. Während in manchen Fällen ein Befruchtungsvorgang in der Peritheziumanlage nicht aufgefunden werden konnte, stellten vor allem Killian und Likhité für eine Anzahl verschiedener Pyrenomyzeten das Vorhandensein echter Sexualakte fest. Es sei hier nur erinnert an das Verhalten von *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. (Killian, 1917; Frey, 1924), *Clariceps purpurea* (Fr.) Tul. (Killian, 1919), *Stigmatea Robertiani* Fr. (Killian, 1922), *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. (Likhité, 1926); näheres siehe bei Kniep (1928, S. 365 ff.). Die Ausbildung und Form der Sexualorgane sowie der Vorgang der Befruchtung selbst zeigen große Mannigfaltigkeit. Auch innerhalb einer Gattung scheinen sich die Arten nicht einheitlich zu verhalten, wie z. B. aus den Untersuchungen an *Gnomonia leptostyla* und *G. erythrostoma* Pers. (Likhité, 1926) hervorgeht.

Es schien deshalb von Interesse, verschiedene Arten ein und derselben Gattung nach der Ausbildung ihrer Sexualität zu untersuchen. Es wurde in der vorliegenden Arbeit die Gattung *Ceratostomella* gewählt, aus welcher schon mehrere Arten eine teilweise Bearbeitung erfahren hatten, und deren Behandlung durch eine von Herrn Professor Lehmann in der Schwäbischen Alb aufge-

fundene, in Eichen lebende Art nahegelegt wurde (vgl. Lehmann, 1932). Die Gattung erweist sich interessant in bezug auf ihre zytologischen Verhältnisse, sowie durch die hier vorkommende Heterothallie (vgl. S. 187). Außerdem traf es sich günstig, daß mehrere Arten in Reinkultur zu beschaffen waren; doch zeigte sich bald, daß einige Arten, die nicht zur Perithezienbildung zu bringen waren, ausgeschieden werden mußten.

Abschnitt I.

Bisherige Untersuchungen an *Ceratostomella*.

Die ersten Untersuchungen in der Gattung *Ceratostomella* wurden von Halsted und Fairchild (1891) an *Ceratostomella fimbriata* ausgeführt. Dieser Pilz, der damals als Erreger der Schwarzfäule der Bataten unter dem Namen *Ceratocystis fimbriata* Ellis und Halsted bekannt war, wurde in Reinkultur beobachtet, und es wurden die Fruchtkörper und das Myzel, besonders die Art der Konidienbildung, beschrieben. Da die Asci wie auch bei den anderen *Ceratostomella*-Arten sehr klein und hinfällig sind, wurden sie damals nicht aufgefunden und die Fruchtkörper als Pykniden bezeichnet.

Im Jahre 1903 beschreibt von Schrenk den Lebenszyklus von *Ceratostomella pilifera* Fries in Reinkultur, und 1906 veröffentlicht Hedgcock seine systematischen Untersuchungen an mehreren Varietäten von *Ceratostomella* und *Graphium*, die er zum Teil während einer Dauer von 4 Jahren in Reinkultur gehalten hatte. Im selben Jahre erscheint auch die Beschreibung von *Ceratostomella adiposa* als *Sphaeronema adiposum* durch Butler (1906). Um den Entwicklungsgang des Pilzes zu verfolgen, stellte Butler Kulturen aus je einer Konidie her und fand dabei, daß in diesen Einkonidienstämmen sowohl Konidien als auch Perithezien gebildet wurden.

Weiter folgt dann die Beschreibung von vier neuen *Ceratostomella*-Arten durch E. Münch (1907): es sind dies die Blaufäulepilze *Ceratostomella pini*, *C. cana*, *C. piceae* und *C. coerulea*. Bei *C. pini* gelang es Münch, Reinkulturen aus Konidien, aus Ascussporen und aus dem Myzel in blaufaulem Holz zu erhalten und auf bestimmten Nährböden reife Perithezien zu erzielen. Auch von *C. cana* erzog Münch Reinkulturen. Um die Zugehörigkeit einer *Graphium*-Fruchtform zu *Ceratostomella* eindeutig nachzuweisen, stellte er von *C. piceae* Einsporkulturen her. Es wurden vier Kulturen aus je einer *Graphium*-Konidie gewonnen; in diesen Kulturen konnten jedoch nur Graphien, aber keine Perithezien beobachtet werden. Münch schreibt darüber: „Das Resultat stimmt mit der allgemeinen Erfahrung überein, daß die Schlauchfruchtform bei den meisten Ascomyzeten nur schwer oder überhaupt nicht aus Konidien zu erzielen ist". Im Anschluß an dieses Resultat erzog Münch eine Anzahl Kulturen aus je einer Ascusspore. Er erhielt 24 lebenskräftige Einsporkulturen, und diese zeigten alle nach etwa 5 Tagen Graphien. Außerdem stellten sich in acht dieser Kulturen nach einigen Wochen Perithezien ein, während sich in den übrigen nur kleine Kugeln entwickelten, die von Münch als unreife Perithezien angesehen wurden. Durch diese Ergebnisse war die Zugehörigkeit eines *Graphiums* zu *C. piceae* mit Sicherheit erwiesen. Auch bei *C. coerulea* stellte Münch Einsporkulturen aus Ascussporen her und fand hierbei, daß diese Art kein *Graphium* als Nebenfruchtform besitzt. Dagegen traten in dem etwa 8 Tage alten Myzel der Einsporkulturen Anfänge von Perithezien auf; es ist jedoch der Veröffentlichung nicht zu entnehmen, ob sich diese Peritheziumanlagen zu reifen Fruchtkörpern weiter entwickelten.

An Münchs Veröffentlichungen schließen sich weitere Untersuchungen, jedoch meist praktischer Fragen an, die im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden können.

Zu erwähnen ist weiterhin die Beschreibung von *Ceratostomella quercus* durch Georgevitch (1926 und 1927). Bei dieser Art wurden Kulturen aus reinen Ascussporen erzogen, und dabei die Zugehörigkeit eines *Graphiums* festgestellt.

Von Dade (1928) wurden die zu dem tropischen Pflanzenschädiger *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) v. Höhnel gehörigen Perithezien aufgefunden und als *Ceratostomella parasitica* beschrieben. Dade konnte die Zusammengehörigkeit der Konidien und Perithezien erweisen und zeigen, daß der Pilz heterothallisch ist. Kulturen aus einzelnen Ascussporen bildeten keine Perithezien; erst in bestimmten Kombinationen konnte Fruchtkörperbildung erzielt werden. Von 7 Einsporkulturen gehörten 5 dem einen und 2 dem anderen Geschlecht an. In einer Einsporkultur fand Dade auch halslose, perithezienartige Bildungen, die ascussporenähnliche Sporen entleerten. Diese Sporen entstanden am Ende zahlreicher fertiler Hyphen. Sie keimten zu einem Myzel aus, das jedoch später degenerierte. Über die Natur dieser Fruchtkörper läßt sich nichts Sicheres aussagen.

Ein noch nicht geklärtes Verhalten zeigt eine von Rumbold (1930) beschriebene, mit Vorbehalt als *C. pilifera* Winter bezeichnete *Ceratostomella*-Art. Von 23 Einsporkulturen traten nur in 4 Kulturen Perithezien auf; in den übrigen wurden nur Graphien gebildet. Zur Erklärung führt die Autorin aus: „A possible reason is suggested for this fact that only 4 out of 23 of the single spore cultures produced perithecia. It may be that the cultures which produced both *Ceratostomella* and *Graphium* came from binucleate spores and the other 19 from uninucleate spores which were plus or minus and thus uncapable of perithecial formation. This could be tested by mixing some of the 19 lines". Hieraus schloß Buismann (1932, S. 1), daß bei paarweiser Kombination solcher nur Graphien bildender Einsporstämme in manchen Fällen in den Kulturen Rumbolds Perithezien aufgetreten seien, und vermutete daher, daß bei dieser Art sogen. +- und —-Rassen vorkommen. Nach brieflicher Mitteilung von C. Rumbold wurden jedoch keine derartigen Testversuche ausgeführt, so daß nichts darüber ausgesagt werden kann, ob tatsächlich +- und —-Stämme bei diesem Pilz bestehen.

Veröffentlichungen über zytologische Untersuchungen sind erst in den letzten zehn Jahren und bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit für nur zwei Arten erschienen.

Elliott (1923) erbrachte für den Schwarzfäulepilz der Bataten, *Sphaeronema fimbriatum*, den Nachweis, daß die Fruchtkörper dieses Pilzes nicht Pykniden, sondern Perithezien darstellen. Die Asci zerfallen frühzeitig und wurden deshalb lange Zeit nicht aufgefunden. Erst bei Untersuchungen an fixiertem und geschnittenem Material wurden sie von Elliott entdeckt und der Pilz nunmehr in die Gattung *Ceratostomella*, als *C. fimbriata*, eingeordnet.

2 Jahre später veröffentlichte Elliott (1925) seine zytologischen Untersuchungen an diesem Pilz. Er fand, daß als Peritheziumanlage ein oogoniumtragender Ast ausgebildet wird, der sich in eine basale Zelle und in ein Oogonium gliedert. Das Oogonium ist einzellig und sein Ende als Trichogyne gestaltet. Diese soll nun nach Elliott mit einem Antheridium in Verbindung treten, wonach der Antheridiumkern durch die Trichogyne ins Oogonium wandert. Die offene Verbindung selbst zwischen Antheridium und Trichogyne wurde von Elliott anscheinend nicht beobachtet. Dagegen hebt er hervor, daß er in zahlreichen Fällen auf gefärbten Präparaten den Antheridiumkern in den verschiedensten Stadien des Abwärtswanderns durch die Trichogyne feststellen konnte. Auf Präparaten, die ältere Stadien der Peritheziumbildung zeigten, konnte Elliott im Oogonium nur einen einzigen, aber größeren Kern beobachten. Er schloß hieraus, daß der Antheridiumkern sich mit dem Oogoniumkern vereinigt hatte. Während in der Entwicklung der Oogoniumzelle eine Ruhepause eintritt

und das einkernige Stadium somit einige Zeit erhalten bleibt, bildet sich aus dicht zusammenschließenden Hyphen die Peritheziumwand aus. Aus dem großen Fusionskern gehen später durch Teilung mehrere, meist acht, kleine Kerne hervor, die zu Paaren in die ascogenen Hyphen auswandern. Diese Kernpaare sollen durch tatsächliches Paaren der Kerne zustande kommen und nicht durch rasch aufeinanderfolgende Kernteilungen, wobei die Tochterkerne keine Zeit hatten, sich voneinander zu entfernen. Die ascogenen Zellen sind vielkernig und verzweigen sich über den ganzen Innenraum des Peritheziums hin, indem sie sich zwischen die großen dünnwandigen Zellen eindrängen, die von der Innenwand ausgehen und deren Funktion in der Ernährung der fertilen Hyphen besteht. Sobald die fertilen Hyphen mit den ernährenden Zellen in Verbindung treten, werden sie von ihrem ursprünglichen Ausgangspunkt unabhängig und scheinen in der Folgezeit der ganzen Wandfläche des Hohlraums zu entspringen. Das vielkernige Stadium der ascogenen Hyphen bleibt selbst noch zu Beginn der Ascusbildung erhalten. Die Ascusmutterzellen entstehen als angeschwollene Enden der fertilen Hyphen und enthalten 2 Kerne, die zum Ascuskern verschmelzen, wonach sich der junge Ascus von den ascogenen Hyphen lostrennt. Durch drei aufeinanderfolgende Kernteilungen entstehen die 8 Sporenkerne, um die sich je eine Plasmamasse zusammenballt, wodurch die Sporen zustande kommen.

Bei der zweiten zytologisch untersuchten Art, *Ceratostomella adiposa* (Butl.) Sartoris, sind die Asci ebenfalls sehr klein und vergänglich, sie wurden erst von Sartoris (1927) aufgefunden. Vorher war der Pilz unter dem Namen *Sphaeronema adiposum* Butler bekannt. Wie schon Butler festgestellt hatte, fand auch Sartoris, daß Kulturen aus je einer Konidie reife Perithezien zur Ausbildung bringen. Bei der zytologischen Untersuchung zeigte sich, daß die Peritheziumanlage aus einem Knäuel dicker Hyphen verschiedenen Ursprungs besteht. Eine Differenzierung in Oogonien und Antheridien konnte nicht beobachtet werden, und auch eine Vereinigung von Kernen benachbarter Zellen oder Hyphen war nicht festzustellen. Die Bildung der ascogenen Hyphen in dem mehrere Zellschichten umfassenden jungen Perithezium beginnt mit dem Auftreten einer zentralen Hyphe, die sich mit Heidenhains Eisenhämatoxylin dunkelblau färbt. Die ascogenen Zellen sind anfangs vielkernig wie bei *C. fimbriata*, und ihre Kerne scheinen paarweise zu liegen, jedoch wahrscheinlich infolge rasch aufeinander folgender Teilungen. Vor der Ascusbildung werden durch Querwände die endständigen zweikernigen Ascusmutterzellen abgetrennt; während diese an Größe zunehmen, verschmelzen die Kernpaare zum Ascuskern. Durch eine Folge von drei Teilungen entstehen die 8 Kerne der Ascussporen. Die Sporenbildung vollzieht sich in der üblichen Weise. Die Ascuswand degeneriert frühzeitig, wonach eine fettige Substanz, die unterdessen im Ascus gebildet wurde, die Sporen zusammenhält.

Die Entwicklung und Ausbildung der Peritheziumwand ist ähnlich wie bei *C. fimbriata*; daneben wird von Sartoris noch die Entstehung des Halses ausführlich beschrieben. —

Während der Ausführung und nach Beendigung der vorliegenden Arbeit erschienen einige weitere Veröffentlichungen über zytologische Untersuchungen und Kulturversuche mit verschiedenen *Ceratostomella*-Arten.

Von Varitchak (1931) wurde der Entwicklungsgang des Peritheziums von *Ceratostomella piceae* Münch verfolgt. Die Anlage des Peritheziums geht von zwei benachbarten Myzelästen aus, einem Ascogon und einer als Trophogon bezeichneten Hyphe. Das Ascogon ist in seinem ersten Entwicklungsstadium als gebogenes Gebilde zu erkennen, das nach mehreren Kernteilungen eine ganze Anzahl Kerne aufweist. Das Trophogon dagegen ist einkernig und wird von dem sich einrollenden Ascogon umschlungen. Diese Peritheziumanlage wird unterdessen von vegetativen Hyphen eingehüllt, worauf das Trophogon verschwindet. Über die Funktion des „Trophogons" in vorliegendem Falle wird nichts ausgesagt. Das

Ascogon ist nunmehr als große, gewundene, vielkernige Zelle deutlich zu erkennen. Es bildet später als seitliche Zweige die ascogenen Hyphen aus, deren Kerne nur selten und dann wahrscheinlich nur zufälligerweise zu Paaren liegen. Bei der weiteren Entwicklung des Peritheziums sind im Innern große vielkernige Zellen zu beobachten; in einem späteren Stadium liegen diese Zellen am Grunde des Peritheziuminnern, während über ihnen die zentrale Peritheziumhöhlung zur Ausbildung gelangt. Aus den an diesen Hohlraum angrenzenden Zellen gehen unter Hakenbildung die Asci hervor. Nach der Kernverschmelzung im Ascus erfolgt anschließend an drei Kernteilungsschritte die Bildung der 8 Sporen. Unmittelbar vor der Reife der Sporen trennt sich der Ascus los und verquillt zu einer gallertigen Masse, wobei die Sporen frei werden. Auch die inneren Zellen der Peritheziumwand und die zentralen Halszellen werden auf diese Weise aufgelöst, so daß die reifen Sporen in einer Gallerte eingebettet den ganzen Innenraum des Fruchtkörpers ausfüllen und schließlich durch den Halskanal ins Freie gelangen.

Buismann (1932) konnte zeigen, daß *Graphium ulmi* Schwarz als Hauptfruchtform die Perithezien einer *Ceratostomella*, die *C. ulmi* genannt wurde, besitzt. Die Perithezien dieses Pilzes wurden durch Kombination verschiedener Stämme von *Graphium ulmi* gewonnen, und durch weitere Kulturversuche auf Ulmenholz wurde Heterothallie erwiesen. Am lebenden Baum wurden die Perithezien bis jetzt noch nicht aufgefunden, anscheinend waren die erkrankten Bäume stets nur von einem Partner befallen.

Weiter fand Gregor (1932) bei Kulturversuchen mit Einsporstämmen von *Ceratostomella pluriannulata* Hedgcock, daß diese Art heterothallisch ist. Es sind 2 Stämme vorhanden, die einzeln kultiviert nur sterile Perithezien zur Entwicklung bringen. Diese Fruchtkörper können zwar bisweilen einen Hals aufweisen, enthalten jedoch nie Sporen. In der Berührungslinie beider Stämme dagegen gelangen normale Perithezien zur Ausbildung. Die Anlage der fertilen sowie der sterilen Perithezien besteht in spiraligen Hyphen, die von Gregor als die weiblichen Geschlechtsorgane gedeutet werden. Es konnte jedoch im Entwicklungsgang der Fruchtkörper weder ein Antheridium noch ein Befruchtungsvorgang entdeckt werden. Gregor vermutete deshalb einen Fall von Heterothallie, der auf verschiedenem Vermögen der Nahrungsaufnahme beider Stämme beruht („nutritive heterothallism"). Sie versuchte in den sterilen Einsporstämmen durch Einwirkung von Chemikalien, ultravioletten Strahlen, extremen Temperaturen usw. reife Perithezien zu erhalten. Ein positiver Erfolg war aber nicht zu verzeichnen.

Von Loos (1932) wurde eine auf Buchenholz vorkommende Art, *Ceratostomella fagi* Loos, gefunden. Diese scheint homothallisch zu sein, da in Einsporkulturen reife Perithezien auftraten.

Für eine weitere, von Georgevitch (1930) beschriebene, in Eichen lebende Art, *Ceratostomella merolinensis* Georgevitch, liegen keine diesbezüglichen Untersuchungen vor.

Abschnitt II.

Eigene Untersuchungen.

A. *Ceratostomella fimbriata* (E. und H.) Elliott.

1. Material.

Das Untersuchungsmaterial entstammte einer Reinkultur von *Ceratostomella fimbriata* (E. und H.) Elliott, die wir im Frühjahr 1930 aus dem Zentralbureau für Pilzkulturen in Baarn er-

hielten. Von Mai 1930 bis Juli 1931 konnte bei dem Pilz keine Perithezienbildung beobachtet werden, trotzdem während dieser Zeit häufig auf frische Nährböden übergeimpft wurde. Meist wurde 5 proz. Malzextraktagar verwendet, auf dem sich ein gleichmäßiges lockeres Luftmyzel entwickelte. Auf anderen üblichen Nährböden, wie Agar oder Gelatine mit Fleischextrakt, Obstsaft usw., auf Brot und Kartoffeln gedieh das Myzel gut, doch trat auch hierauf keine Perithezienbildung ein. Auf trockenen und stark sauren Nährböden entwickelte sich das Myzel spärlich und zeigte polsterförmigen Wuchs. Nach häufigem Überimpfen auf die verschiedensten Nährsubstrate traten plötzlich im Juli 1931 in mehreren Kulturen zahlreiche Perithezien auf, die nach etwa 3 Wochen reife Ascussporen entleerten. Von nun an wurden die Perithezien äußerst reichlich in fast allen nachfolgenden Kulturen gebildet; als Nährboden wurde 5 proz. Malzextraktagar beibehalten.

2. Kulturversuche.

Elliott beobachtete bei seinen Kulturen von *Ceratostomella fimbriata*, daß die Perithezien oft in Gruppen beisammenstehen, und vermutete daher, daß diese Peritheziengruppen die Kreuzungsstellen zweier verschiedener Myzelien bezeichneten. Außerdem konnte er bei der zytologischen Untersuchung feststellen, daß Oogonium und Antheridium häufig verschiedenen Myzelästen entstammen. Diese Beobachtungen führten Elliott zu der Vermutung, daß *C. fimbriata* eine heterothallische Form ist. Ein Beweis für das Vorhandensein zweier verschiedener Stämme fehlte jedoch bisher. Um diese Frage zu untersuchen, wurden zunächst eine Anzahl Einsporkulturen hergestellt und diese auf ihr Verhalten geprüft.

a) Methode. Die Herstellung der Einsporkulturen bot anfangs einige Schwierigkeiten, da die Sporen sehr klein (4,5 : 4,5 μ) und hyalin sind und außerdem durch eine schleimige Substanz zusammengehalten werden. Bei der angewandten Isolierungsmethode, die selbst bei den noch kleineren Sporen von *C. coerulea* (2,5 : 4,8 μ) und *C. quercus* (1,9 : 3,2 μ) die Herstellung einwandfreier Einsporkulturen gestattete, wurden nicht die Sporen selbst, sondern deren Keimlinge verwendet. Die frisch entleerten Sporen eines Peritheziums werden mit der Impfnadel auf einem sterilen Deckglas in einem Wassertropfen verteilt. Wenn sie sich voneinander gelöst haben, wird eine kleine Menge dieser Sporenemulsion auf ein

zweites Deckglas gebracht, das sodann einer feuchten Kammer aufgesetzt wird. Wenn sich bei der mikroskopischen Durchmusterung zeigt, daß ein solcher Flüssigkeitstropfen mehrere Einzelsporen enthält, wird er mit etwas flüssig gemachtem, mehrfach filtriertem Nähragar vermischt. Es ist zweckmäßig, vor der Zugabe des Agars die Sporenemulsion mit Wasser noch zu verdünnen; man erreicht dadurch, daß sich die Sporen im Agar gleichmäßiger verteilen. Außerdem wird hierdurch eine Schädigung der Sporen durch den erwärmten Agar vermieden. In der Agarschicht eingebettet keimen nun die Sporen in der feuchten Kammer und haben nach etwa 12 Stunden einen bis zwei dicke Keimschläuche getrieben, so daß die Keimlinge bei der mikroskopischen Beobachtung leicht aufzufinden sind. Nachdem die Lage einzelner Keimlinge auf der Oberseite des Deckglases bezeichnet ist, können sie herausgeschnitten werden. Jeder solche, einen einzelnen Keimling enthaltende Agarwürfel wurde sorgfältig nach etwa noch ungekeimten Sporen durchsucht und nur, wenn er ganz einwandfrei war, in ein Kulturgefäß mit frischem Nähragar gebracht. Vor allem dürfen bei dieser Methode nur ganz frisch entleerte Ascussporen verwendet werden; denn bei diesen läßt sich der Schleim noch verhältnismäßig leicht in Wasser zerteilen, so daß die Sporenklumpen zu Einzelsporen zerfallen. Außerdem keimen die frisch entleerten Sporen fast gleichzeitig und zu annähernd 100 %. Man erhält also neben Keimlingen nur selten ungekeimte Sporen, die beim Isolieren übersehen werden könnten, um dann später in den Einsporkulturen noch auszukeimen.

b) Einsporkulturen. Es wurden nach dieser Methode 70 Kulturen aus je einer Ascusspore und 46 Kulturen aus je einer Konidie gewonnen. Nach durchschnittlich 3 Wochen traten in 113 dieser Kulturen reife Perithezien in großer Zahl auf. Die übrigen 3 Kulturen waren durch Bakterien verunreinigt, doch konnte auch hier nach 1—2maligem Überimpfen Perithezienbildung erzielt werden. Die Einsporkulturen unterschieden sich in keiner Weise von den gewöhnlichen Kulturen, auch zeigten sie wie diese bisweilen das gruppenweise Auftreten der Perithezien. Von einer Anzahl dieser Einsporstämme wurden durch Überimpfen von Ascussporen mehrere Generationen erzogen, und dabei konnte kein Nachlassen in der Fruchtbarkeit beobachtet werden. Das Ergebnis zeigt somit eindeutig, daß *Ceratostomella fimbriata* zur Bildung reifer Ascussporen nicht des Zusammen-

kommens zweier Myzelien verschiedengeschlechtlicher Tendenz bedarf, sondern daß das Myzel aus einer einzelnen Spore zur Perithezienbildung befähigt ist und der Pilz somit homothallisch ist.

3. Zytologische Untersuchungen.

An gefärbten Präparaten ließ sich nach Elliott das Abwärtswandern eines männlichen Kernes durch die Trichogyne beobachten. Eine Öffnung in der Wand zwischen Trichogyne und Antheridium und das Übertreten des männlichen Kernes wurde dagegen von Elliott, wie oben erwähnt, nicht gefunden. Als Ergänzung zu Elliotts Veröffentlichung wurde die folgende Untersuchung aufgenommen, wobei besonderer Wert darauf gelegt wurde, die von Elliott beschriebenen Sexualorgane aufzufinden und den Vorgang der Befruchtung zu verfolgen.

a) Methode. Das Material wurde gewöhnlichen als auch Einsporkulturen entnommen und in verschiedenen Entwicklungsstadien fixiert. Als Fixierungsmittel gelangten die schwache Flemmingsche Lösung (Einwirkungsdauer 10—15 Minuten) und die starke Flemmingsche Lösung (10—15 Minuten), die zur Hälfte mit Wasser verdünnt wurde, zur Anwendung, während Bouin (2stündige Einwirkung) nur bei älteren Perithezien brauchbare Resultate ergab. Das fixierte Material kam nach dem Entwässern mittels Alkohol über Xylol in Paraffin (52°). Für die Untersuchung der allerersten Peritheziumanfänge wurden Mikrotomschnitte bis zu 15 μ Dicke verwendet. Auf diesen ließ sich die Peritheziumanlage ganz verfolgen, ohne angeschnitten zu sein. Für die folgenden Entwicklungsstadien wurden 5—10 μ dicke Schnitte hergestellt. Zur Kernfärbung eignete sich Heidenhains Eisenhämatoxylin am besten, das deshalb ausschließlich verwendet wurde. Bei einem Teil der Präparate wurde das Plasma in alkoholischer, schwacher Eosinlösung gefärbt; bei den übrigen Präparaten wurde keine besondere Plasmafärbung vorgenommen.

Die Zeichnungen, mit Ausnahme von Fig. 1, wurden mit dem Abbeschen Zeichenapparat und Zeissmikroskop ausgeführt. Tubuslänge 160 mm, Obj.: Homogene Ölimmersion 1,5 mm n. A. 1,3, Eigenvergrößerung 120 ×. Okular: Komp. Okular 20 × u. 7 ×. Es ergaben sich hiermit bei Anwendung des Zeichenapparates die Vergrößerungen 4560 × u. 1596 ×. Verkleinerungen bei der Re-

produktion: Fig. 2—12, 25 und 27—41 auf $^1/_2$, Fig. 13—24, 26 und 42—45 auf $^1/_3$.

b) Peritheziumanlage. Die ersten Anfänge der Peritheziumbildung wurden außer auf gefärbten Präparaten auch in der feuchten Kammer verfolgt. Sie treten etwa 5—6 Tage nach dem Aussäen der Sporen als kurze Seitenzweige am Myzel auf, deren Enden sich spiralig einrollen. Diese Gebilde zeichnen sich meist durch dichteres Plasma vor den übrigen Zellen aus und zeigen daher auf den Präparaten dunklere Färbung. Sie sind meist nicht gleichmäßig über die Kultur verteilt, sondern treten oft herdenweise auf, so daß die sich daraus entwickelnden Perithezien später in Gruppen beisammen stehen.

Das früheste Stadium, das sich als Peritheziumanlage erkennen läßt, ist das hakenförmig gebogene Ende eines kurzen Hyphenzweiges, wie es in Fig. 1 *a*, *b*, *d* und Fig. 2 abgebildet ist. Dieser Zweig besteht aus einer oder wenigen gerade gestreckten basalen Tragzellen und aus dem gebogenen Hyphenende. Fig. 1 *a*, *c* und *e* zeigt Peritheziumanfänge, bei denen die Anlage mehrere Tragzellen besitzt.

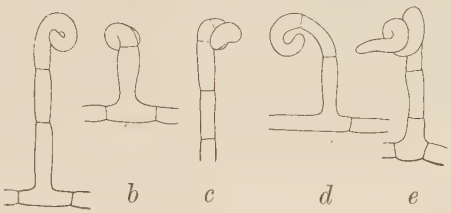

Fig. 1.

Peritheziumanfänge von *Ceratostomella fimbriata* (nach lebendem Material in der feuchten Kammer).

Wie die Zellen des vegetativen Myzels, so enthalten auch die des sich krümmenden Hyphenastes einen sehr kleinen Zellkern. Die in den folgenden Abbildungen schwarz ausgefüllten Kerne entsprechen nicht den ganzen Zellkernen. Der Zellkern umfaßt vielmehr außerdem noch eine Vakuole, die jedoch nur in bestimmten Entwicklungsstadien des Pilzes, z. B. vor und nach der Kernverschmelzung im Ascus, deutlich sichtbar ist (Fig. 26 und Fig. 27—30). Meist ist die Kernvakuole nur undeutlich zu erkennen, da sie mit unscharfem Rand in das umgebende Plasma übergeht. Es wird deshalb im Folgenden der Einfachheit halber nur der in den Präparaten gefärbte Kernanteil als Kern bezeichnet.

Wie das Wachstum der spiraligen Peritheziumanlage erfolgt, läßt sich aus den Fig. 2—11 erkennen. In Fig. 2 beginnt eben die Krümmung eines solchen Hyphenendes; die langgestreckte terminale Zelle enthält schon zwei Kerne, so daß baldige Zellteilung

erfolgen müßte. In Fig. 3 ist zwischen den beiden Kernen eines solchen Hakens bereits eine Wand ausgebildet, und somit die Gliederung in die gerade Tragzelle und das gebogene Ende des Astes zu erkennen. Die terminale Zelle wächst nun an der Spitze weiter, indem sie eine spiralige Drehung beschreibt (Fig. 1*c*, 1*e* und Fig. 4). Durch Kernteilung und nachfolgende Wandbildung gliedert sie sich dabei in zwei kurze einkernige Zellen. In der neugebildeten Endzelle geht hierauf dieser Zellbildungsvorgang weiter, und dadurch kommt schließlich eine mehrzellige Spirale zustande (Fig. 10, 11 u. 12).

Fig. 2.

Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 5

Fig. 2. Jüngstes Stadium, das sich als Peritheziumanlage zu erkennen gibt. Vergr. 2280 ×.
Fig. 3. Das gebogene Ende des Hyphenzweiges ist durch eine Wand abgetrennt. Vergr. 2280 ×.
Fig. 4. Die gebogene terminale Zelle enthält zwei Kerne. Von der Tragzelle entspringt die erste Hüllhyphe. Vergr. 2280 ×.
Fig. 5. Das gebogene Ende besteht aus zwei einkernigen Zellen; die erste Hüllhyphe tritt als Auszweigung der Tragzelle auf. Vergr. 2280 ×.

In Fig. 4 besteht die Windung noch aus einer Zelle, doch enthält sie schon zwei Kerne; diese sind in Fig. 5 bereits durch eine Wand getrennt. Die Fig. 6 und 8 zeigen das folgende Stadium, wo in der neugebildeten terminalen Zelle wieder Kernteilung stattgefunden hat. In Fig. 7 sind auch diese Kerne wieder durch eine Wand getrennt, so daß die Spirale aus drei einkernigen Zellen besteht. Bei dieser Art der Zellbildung sind die älteren Zellen der Spirale einkernig, während die Endzelle oft zwei Kerne aufweist. Nur in wenigen Fällen konnte beobachtet werden, daß auch in einer

der älteren Zellen noch Kernteilung erfolgt (Fig. 9). Ob jedoch auch die Zelle sich hierauf teilt, konnte nicht festgestellt werden. Wahrscheinlich wandert einer der beiden Tochterkerne in diesem Fall in die manchmal von solchen Zellen ausgehenden, später noch zu erwähnenden Verzweigungen aus.

Bisweilen kommt es vor, daß die Wandbildung den rasch erfolgenden Kernteilungen nicht folgen kann und sich wie in Fig. 11

Fig. 6.

Fig. 7.

Fig. 8.

Fig. 9.

Fig. 6. Das auf Fig. 5 folgende Stadium in der Entwicklung der Peritheziumanlage. In der Endzelle hat sich der Kern geteilt, die erste Hüllhyphe ist als Seitenast der Tragzelle zu erkennen. Vergr. 2280 ×.

Fig. 7. Die Peritheziumanlage weist zwei vollständige Windungen auf und besteht aus drei Zellen mit je einem Kern. Zwischen die Windungen schiebt sich die erste Hüllhyphe ein (der nicht schwarz ausgefüllte Kern liegt in der ältesten Zelle der Spirale und ist von der terminalen Zelle verdeckt). Vergr. 2280 ×.

Fig. 8. Die Spirale ist zweizellig, die terminale Zelle enthält zwei Kerne (der nicht schwarz ausgefüllte Kern liegt tief). Von der Tragzelle entspringt die erste Hüllhyphe. Die zweite Hüllhyphe ist als kurzer Seitenast der nächst jüngeren Zelle zu erkennen. Vergr. 2280 ×.

Fig. 9. Die Spirale besteht aus zwei Zellen, die subterminale Zelle ist zweikernig. Die Hüllhyphe hat sich von der Tragzelle durch eine Wand abgetrennt. Vergr. 2280 ×.

einer der beiden Kerne der Endzelle schon wieder teilt, ehe zwischen ihm und seinem Schwesterkern eine Wand ausgebildet ist. Doch ist es auch in diesem Fall der terminale Kern, der sich teilt.

Während der Ausbildung der Spirale wird als Auszweigung der anschließenden Tragzelle die erste Hüllhyphe des jungen Peritheziums gebildet. Sie kann schon auftreten, ehe die Spirale noch eine vollständige Windung aufweist, kann aber auch erst später,

wenn schon mehrere Windungen vorhanden sind, ausgebildet werden. Sie ist jedoch fast immer nach der Seite gerichtet, nach der die erste Windung der jungen Peritheziumanlage erfolgte. Auf den Fig. 4, 5 und 6 läßt sich der Beginn dieser Hyphe als kurzer Auswuchs der Tragzelle erkennen, der dem Ende der Spirale zuwächst und sich zwischen die Windungen eindrängt (Fig. 7 und 8) oder sich diesen dicht anschließt, wie in Fig. 9. Hier hat sich außerdem diese Hüllhyphe bereits durch eine Wand von der Tragzelle abgetrennt. Fig. 8 zeigt das Auftreten der zweiten Hüllhyphe. Diese

Fig. 10.

Fig. 11.

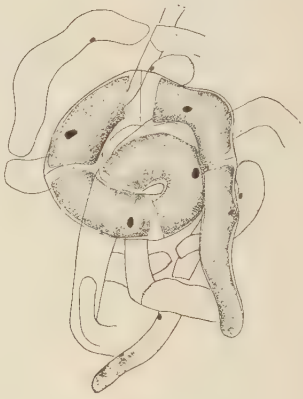

Fig. 12.

Fig. 10. Die spiralige Peritheziumanlage besteht aus vier einkernigen Zellen (der nicht ausgefüllte Kern liegt in der zweiten Zelle der Spirale). Vergr. 2280 ×.

Fig. 11. Die Spirale besteht aus drei kurzen einkernigen und einer langgestreckten terminalen Zelle, die zwei Kerne enthält, von denen der terminale eben in Teilung begriffen ist. Vergr. 2280 ×.

Fig. 12. Die Spirale läßt sich inmitten zahlreicher Hüllhyphen noch verfolgen; ihre Zellen sind einkernig und haben sich z. T. voneinander entfernt. Vergr. 2280 ×.

entsteht nicht so regelmäßig wie die erste, sondern kann durch Verzweigung aus der ersten Hüllhyphe hervorgehen oder einer der älteren Zellen der Spirale entstammen (Fig. 8). In diesem Falle muß sich also der Kern einer solchen Zelle teilen, und es ist deshalb zu vermuten, daß die bisweilen beobachteten zweikernigen älteren Zellen solche Hüllhyphen zur Ausbildung bringen. In den Fig. 10, 11 und 12 läßt sich die Spirale noch deutlich verfolgen, während die Hüllhyphen sich rasch verzweigen und deshalb ihre Herkunft bald nicht mehr erkennen lassen.

c) Ascogon. Nachdem die Spirale von einer mehrschichtigen Hülle umschlossen ist, schwellen ihre mittleren Zellen an, wobei sie auseinanderweichen und ihre Kerne an Größe zunehmen. In einer der angeschwollenen Zellen setzt alsdann Kernteilung ein, und diese Zelle möchte ich nun als Ascogon bezeichnen. In Fig. 13 und 14 ist dieses Stadium zur Darstellung gebracht; der Kern des jungen Ascogons hat sich hier einmal geteilt. Manchmal setzt auch in zwei benachbarten Zellen Kernteilung ein, so daß zwei Ascogone ausgebildet werden. Auf diese erste Kernteilung folgen weitere; in Fig. 15 hat sich einer der Tochterkerne soeben geteilt, und in Fig. 16 enthält das Ascogon vier große Kerne. Fig. 17 zeigt ein Ascogon, in dem sich drei Kerne eben geteilt haben.

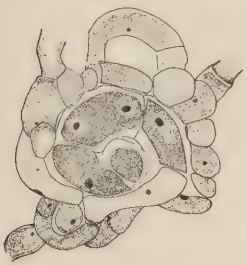

Fig. 13.

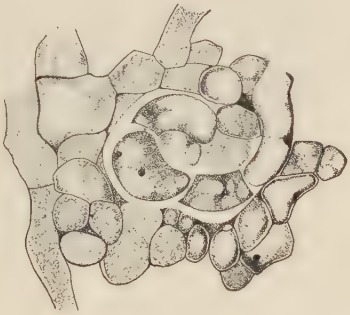

Fig. 14.

Fig. 15.

Fig. 13 und 14. Perithezien mit zweikernigem Ascogon; die Zellen der Spirale haben sich voneinander entfernt, ihre Zellwände lassen sich nur noch teilweise erkennen. Vergr. 1520 ×.
Fig. 15. Ascogon mit drei Kernen. Vergr. 1520 ×.

Die sechs Tochterkerne liegen noch beisammen, der siebente Kern liegt weiter entfernt und ist größer, würde sich also vermutlich noch geteilt haben. Auch in Fig. 18, wo das Ascogon acht Kerne enthält, sind die Tochterkerne zum Teil noch zu erkennen. Im fertig ausgebildeten Ascogon beträgt die Zahl der Kerne meist 8; doch wurden auch Ascogone mit zehn Kernen gefunden. Die Kerne des Ascogons sind im Gegensatz zu denen des vegetativen Myzels sehr groß, meist sind sie auch größer als die der benachbarten Zellen der Spirale. Ihre Vakuolen sind jedoch nicht immer deutlich sichtbar.

Während das Ascogon an Größe zunimmt, werden die Zellwände der Spirale undeutlich. Solange die Windungen ausgebildet

wurden, waren die Wände noch deutlich zu erkennen (Fig. 2—12). Aber sobald die Herausdifferenzierung des Ascogons erfolgt, werden sie undeutlich (Fig. 13—16), anscheinend im Zusammenhang mit der starken Größenzunahme der Zellen. Das Ascogon liegt deshalb als scheinbar nackte Zelle in der von Hüllhyphen umschlossenen Höhlung. Der Verlauf der Spirale läßt sich jetzt meist nicht mehr verfolgen. Die Zellwände sind nicht mehr zu erkennen, und die schmale Plasmaverbindung zwischen den einzelnen Zellen ist auf den Präparaten oft nicht getroffen oder schwer aufzufinden.

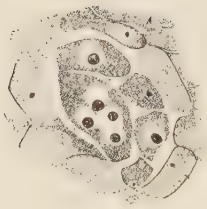

Fig. 16.

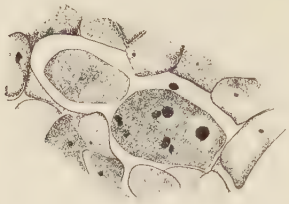

Fig. 17.

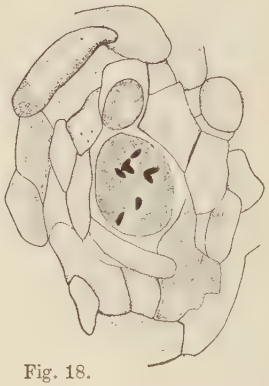

Fig. 18.

Fig. 16. Vierkerniges Ascogon. Die rechts vom Ascogon gelegenen plasmareichen Zellen stellen anscheinend die Zellen der ursprünglichen Spirale dar. Vergr. 1520 ×.

Fig. 17. Drei Ascogonkerne haben sich eben geteilt, die sechs Tochterkerne liegen noch zu Paaren beisammen; der siebente Kern liegt einzeln, hätte sich also wahrscheinlich noch geteilt. Vergr. 1520 ×.

Fig. 18. Ascogon mit acht Kernen. Vergr. 1520 ×.

Fig. 16 zeigt, daß die rechts von der Ascogonzelle gelegenen Zellen ihrer Lage und Gestalt nach die ehemaligen Zellen der Spirale darstellen müssen.

d) Ascogene Zellen. Im Laufe der weiteren Entwicklung rücken die Ascogonkerne auseinander, worauf sich die Zelle teilt. In Fig. 19 hat sich das Ascogon in zwei Tochterzellen mit je vier Kernen geteilt, während in Fig. 20 eine Tochterzelle mit nur zwei Kernen abgetrennt wurde. Daß in diesem Fall die zweikernige Zelle durch Teilung aus der Ascogonzelle hervorgegangen ist, läßt sich an dem schmalen, geradlinig verlaufenden Zwischenraum zwischen den beiden Zellen ersehen. Die Tochterzellen des Ascogons erhalten mindestens zwei Kerne, doch wird in ihnen durch weitere

Kernteilungen die Anzahl der Kerne rasch vermehrt. In Fig. 21 sind zwei solche Zellen mit je acht Kernen abgebildet (der punktiert gezeichnete Kern gehört der tieferliegenden Zelle an und ist verdeckt). Während dieser Kernteilungen schreitet auch die Zellteilung fort. Die neugebildeten Zellen weichen auseinander und runden sich ab, so daß das Innere des Peritheziums schließlich aus vier bis sechs mehrkernigen Zellen besteht. Fig. 22 zeigt einen Längsschnitt durch ein Perithezium, das drei solche Zellen mit zusammen acht Kernen enthält. In Fig. 23 ist ein Perithezium abgebildet, das fünf, durch Teilung aus dem Ascogon hervorgegangene Zellen besitzt; die

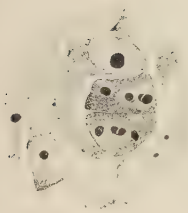

Fig. 19.

Fig. 20.

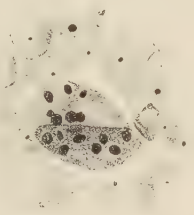

Fig. 21.

Fig. 19. Die Ascogonzelle hat sich in zwei vierkernige Tochterzellen geteilt. Vergr. 1520 ×.

Fig. 20. Das Ascogon hat sich in zwei Zellen geteilt, eine der Tochterzellen enthält nur zwei Kerne. Vergr. 1520 ×.

Fig. 21. Die beiden Tochterzellen des Ascogons mit je acht Kernen (der punktiert gezeichnete Kern ist von der höher liegenden Zelle verdeckt). Vergr. 1520 ×.

einzelnen Teilungsschritte lassen sich zum Teil aus der Gestalt und Größe der Zellen ablesen. Diese mehrkernigen Zellen teilen sich nun weiter in vorwiegend zweikernige Zellen, die ihrerseits durch weitere Kern- und Zellteilungen hauptsächlich zweikernige Zellen zur Ausbildung bringen. Als vorübergehendes Stadium sind hierbei drei- und vierkernige Zellen zu beobachten (Fig. 24). Diese zweikernigen Zellen sind als die ascogenen Zellen zu bezeichnen, da aus ihnen später die Asci hervorgehen.

Nicht selten kommen auch einkernige Zellen zur Ausbildung, wie die Fig. 25 und 36 zeigen. Ob aber diese Einzelkerne durch

Teilung ein Kernpaar herstellen können, war nicht mit Sicherheit festzustellen. Da jedoch bei der später erfolgenden Ascusbildung sämtliche Zellen des Peritheziuminnern aufgebraucht werden, also auch die einkernigen Zellen, im Ascus jedoch regelmäßig zwei Kerne verschmelzen, ist anzunehmen, daß aus einem solchen einzelnen Kern das Kernpaar einer ascogenen Zelle hervorgehen kann.

Elliott bildet in seinen Fig. 14 und 15 ascogene Hyphen ab, die aus äußerst dünnen und langen Zellen bestehen und eine große Anzahl Kernpaare enthalten. Solche Zellen konnte ich jedoch nicht finden. Vielmehr läßt sich auf den Präparaten beobachten, daß

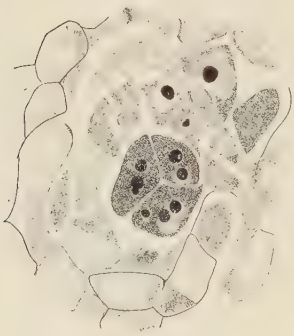

Fig. 22.

Fig. 23.

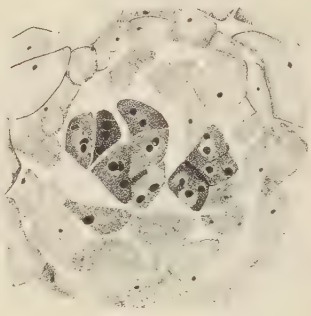

Fig. 24.

Fig. 22. Inneres eines Peritheziums mit drei durch Teilung aus dem Ascogon hervorgegangenen Zellen. Vergr. 1520 ×.

Fig. 23. Fünf zwei- bis dreikernige Zellen im Innern eines Peritheziums. Die beiden tiefliegenden Zellen enthalten je drei Kerne (punktiert gezeichnet). Vergr. 1520 ×.

Fig. 24. Beginn der Bildung von hauptsächlich zweikernigen Zellen im jungen Perithezium. Die in den Hohlraum hineinragenden anscheinend nackten Zellen dienen vermutlich der Ernährung der fertilen Zellen. Vergr. 1520 ×.

jedes Kernpaar in einer eigenen Zelle liegt. Die Zellwände selbst lassen sich zwar nicht erkennen, aber zwischen den einzelnen, oft kugeligen Plasmakörpern dieser Zellen ist ein schmaler, nicht gefärbter Zwischenraum vorhanden (Fig. 24, 25 u. Fig. 36). Eine Färbung dieser Zwischenräume war mit keinem der gebräuchlichen Farbstoffe zu erzielen.

Die ascogenen Zellen folgen nicht in fortlaufender Richtung aufeinander, sondern bei fast jeder Zelle wird die Wachstumsrichtung geändert, so daß ein äußerst reich verzweigtes System zustande kommt. Man erhält deshalb auf Schnitten ein scheinbar

zusammenhangloses Gewirr von ascogenen Zellen. Fig. 25 stellt einen Längsschnitt durch ein Perithezium in diesem Entwicklungsstadium dar.

e) Peritheziumhals. Die Entstehung des Peritheziumhalses wird von Sartoris für *C. adiposa* eingehend beschrieben, und die dort geschilderte Entwicklung trifft auch für *C. fimbriata*

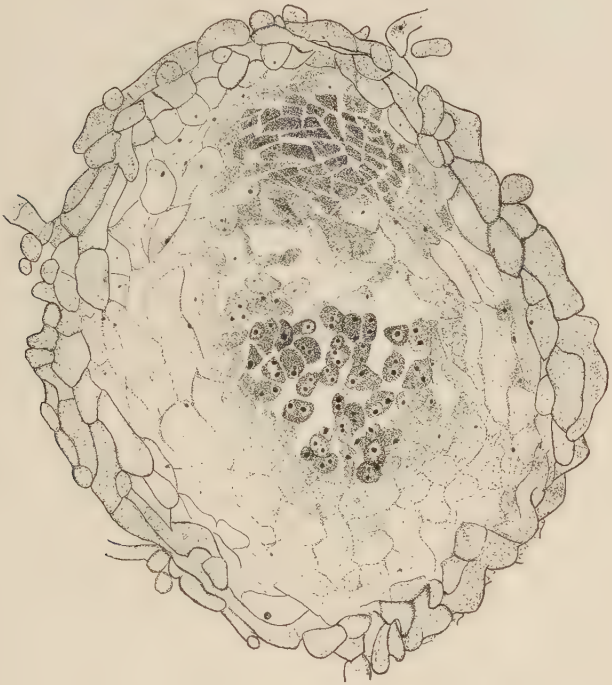

Fig. 25.

Längsschnitt durch ein Perithezium von *Ceratostomella fimbriata* mit ascogenen Zellen. Über dem Hohlraum ist die Halsanlage als eine Masse dunkel gefärbter Zellen zu erkennen. Vergr. 798 ×.

zu. Auf Fig. 24 läßt sich die Halsanlage als eine Masse plasmareicher, über dem Hohlraum des Peritheziums gelegener Zellen erkennen. Auf Präparaten, die nach der Azanfärbemethode behandelt worden waren, ließ sich außerdem feststellen, daß bei der Ausbildung des Halskanals von den später sich auflösenden zentralen Halszellen Schleim abgeschieden wird.

f) Perithe ziumwand. Die Wand des Perithe ziums besteht aus mehreren Zellschichten. Auf 2—3 Schichten dickwandiger, brauner Zellen, die den Abschluß nach außen bilden, folgt nach innen eine Zone großer, dünnwandiger Zellen, die ihren Inhalt verlieren, je weiter die Bildung der ascogenen Zellen fortschreitet. Im reifen Perithezium ist diese Zone schließlich auf eine schmale Schicht reduziert, in der sich die einzelnen Zellen nicht mehr erkennen lassen. Die innerste Zellschicht dieser Zone, die an den Hohlraum des Perithe ziums anschließt und mit den ascogenen Zellen in Verbindung steht, behält ihren plasmatischen Inhalt am längsten bei. Sie entnimmt augenscheinlich den weiter nach außen gelegenen Zellen die Nährstoffe, um sie an die ascogenen Zellen weiter zu geben. In früheren Entwicklungsstadien (Fig. 24) ragen diese plasmareichen Zellen in den Hohlraum des Perithe ziums hinein und schließen sich an die ascogenen Zellen an. Da diese ernährenden Zellen schließlich den ganzen Hohlraum auskleiden, entspringen auch die ascogenen Zellen der ganzen inneren Wandfläche des Perithe ziums. Erst wenn bei der Ascusbildung die ascogenen Zellen aufgebraucht sind, sind auch diese ernährenden Zellen erschöpft.

g) Ascus- und Sporenbildung. Wenn der Fruchtkörper eine bestimmte Größe erreicht hat und das Innere eine Anzahl ascogener Zellen enthält, etwa wie in Fig. 25, setzt die Ascusbildung ein. Sie beginnt zuerst bei den dem Hals zunächst gelegenen Zellen, während gegen die Wand zu noch zweikernige Zellen ausgebildet werden. Schnitte durch ein solches Perithezium zeigen deshalb ascogene Zellen neben Asci und reifen Ascussporen.

Die Kerne der ascogenen Zellen sind meist kugelig und liegen in hellen Vakuolen, die jedoch mit unscharfen Rändern in das umgebende Plasma übergehen (Fig. 25 und Fig. 30). Bei der Ascusbildung wächst eine paarkernige Zelle nach einer freien Seite hin aus, die beiden Kerne nähern sich, und ihre Vakuolen verschmelzen zu einer einzigen größeren, die einen scharfen Rand besitzt. Hierauf vereinigen sich auch die Kerne selbst. In Fig. 27 sind die beiden Kerne in der gemeinsamen Vakuole zu sehen. Diese ist nun groß und scharf umrissen. Fig. 28 zeigt zwei Kerne, die eben im Begriff sind zu verschmelzen. In der oberen Zelle von Fig. 29 ist die Vereinigung noch nicht ganz vollständig; bei der mikroskopischen Betrachtung läßt sich erkennen, daß der Kern aus zwei Teilen besteht. Die Ascusbildung kann auch von einer vier-

kernigen Zelle aus erfolgen, wie Fig. 26 zeigt. Die Figur stellt einen Querschnitt durch das Innere eines Peritheziums dar; bei × ist eine Zelle mit vier Kernen zu sehen, von denen je zwei sich eben vereinigen. Daß dieses Bild keine Kernteilung darstellt, geht aus der ovalen Form der Kerne und dem Vorhandensein

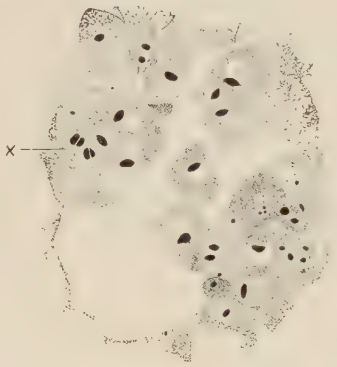

Fig. 26.

Querschnitt durch das Innere eines fast reifen Peritheziums. Die jungen Asci lassen sich an ihrem großen ovalen Kern mit der deutlichen Vakuole erkennen. Bei × ist eine vierkernige Zelle zu sehen, deren Kerne paarweise verschmelzen. Vergr. 1520 ×.

deutlicher Vakuolen hervor; die Zellteilung konnte in diesem Fall anscheinend den Kernteilungen nicht folgen. Daneben zeigt diese Abbildung eine Anzahl Asci mit verschmolzenen Kernen. Die Asci zeichnen sich in diesem Stadium durch ihre großen elliptischen bis beinahe spindelförmigen Kerne aus, die stets der Wand der Vakuole anliegen (vgl. Fig. 30). Die Gestalt und Größe der

Fig. 27.

Fig. 28.

Fig. 29.

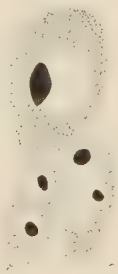

Fig. 30.

Fig. 27 und 28. Die beiden Kerne einer Ascusmutterzelle während ihrer Vereinigung; die Vakuolen sind schon verschmolzen. Vergr. 2280 ×.

Fig. 29. Rechts eine paarkernige ascogene Zelle, links eine Zelle, in der die Kerne fast vollständig verschmolzen sind. Vergr. 2280 ×.

Fig. 30. Zwei ascogene Zellen mit je zwei Kernen, darüber ein Ascus mit dem typischen elliptischen Kern und der scharfen Vakuole. Vergr. 2280 ×.

Asci ist durch die jeweiligen Raumverhältnisse bestimmt und deshalb sehr verschieden.

Der Verlauf der nun folgenden Kernteilung konnte nicht genau verfolgt werden. Die Vakuole verliert ihren scharfen Rand, und der Kern scheint sich in mehrere Stücke von unregelmäßiger bis fadenförmiger Gestalt zu teilen, die sich in der undeutlich zu erkennenden Vakuole verteilen. Fig. 31—34 stellen solche Kernteilungsbilder dar. Als Resultat dieses Prozesses treten zwei Kerne auf (Fig. 35), die bedeutend kleiner sind als die Ausgangskerne.

Fig. 31. Fig. 32. Fig. 33. Fig. 34.

Fig. 31—34. Bilder von der ersten Teilung des Ascuskernes. Vergr. 2280 ×.

Bei den beiden nachfolgenden Kernteilungen ist nichts von einem derartigen Vorgang zu beobachten.

Nach der zweiten Kernteilung enthält der Ascus vier äußerst kleine Kerne (Fig. 36). Zwischen der zweiten und dritten Teilung trennt sich nun eine zentrale, die vier Kerne enthaltende Plasmamasse von dem peripheren Teil des Ascus los (Fig. 37 und 38). Ob zwischen der peripheren und der zentralen Zone eine Wand oder ein Hohlraum ausgebildet wird, ließ sich nicht feststellen.

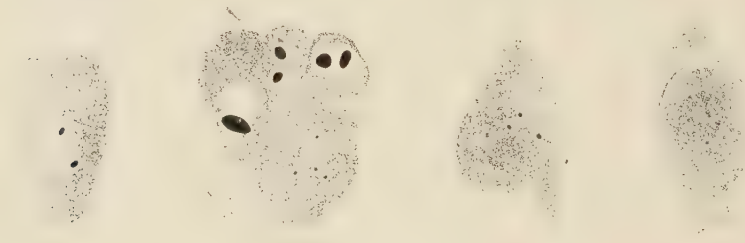

Fig. 35. Fig. 36. Fig. 37. Fig. 38.

Fig. 35. Ascus nach der ersten Kernteilung mit zwei kleinen Kernen. Vergr. 2280 ×.
Fig. 36. Links ein junger Ascus nach der Kernverschmelzung, rechts unten ein Ascus nach der zweiten Kernteilung mit vier kleinen Kernen; darüber eine paarkernige ascogene Zelle und zwei einkernige Zellen. Vergr. 2280 ×.
Fig. 37 und 38. Trennung des Ascus in eine zentrale und eine periphere Zone. Vergr. 2280 ×.

In den mit Heidenhains Eisenhämatoxylin gefärbten Präparaten zeigt sich die Trennungslinie als schmaler, ungefärbter Streifen. Die vier Kerne der inneren Zone teilen sich hierauf nochmals (Fig. 39), worauf das Plasma von Vakuolen durchsetzt wird und die einzelnen Plasmaportionen sich um die Kerne zusammenballen (Fig. 40). Aus der abgetrennten äußeren Zone geht die Ascuswand hervor. Bei der Sporenbildung verwischt sich die Grenze zwischen dem zentralen und dem peripheren Teil, und die Sporen füllen den ganzen Innenraum des Ascus aus (Fig. 41). Jede einzelne Spore ist von einer Schleimschicht umgeben (Fig. 41), die nach dem Zerfall der Ascuswand die Sporen zusammenhält.

Fig. 39.

Fig. 40.

Fig. 41.

Fig. 39. Ascus zwischen der zweiten und dritten Kernteilung. Vergr. 2280 ×.
Fig. 40. Ascus während der Sporenbildung. Vergr. 2280 ×.
Fig. 41. Fertig ausgebildeter Ascus mit den acht Sporen, die je von einer Schleimschicht umgeben sind. Vergr. 2280 ×.

Die Form des reifen Ascus ist nicht regelmäßig, sie wechselt von kugel- bis birnförmig. Der in Fig. 41 abgebildete Ascus weist die am häufigsten beobachtete Gestalt auf; Fig. 40 stellt einen extremen Fall dar. In den reifen Sporen lassen sich die Kerne nicht mehr erkennen, da die Sporen in diesem Stadium sich mit Heidenhain schwarz färben und bei der Anwendung anderer Farbstoffe die äußerst kleinen Kerne nicht scharf genug hervor-

treten. Die Größe der reifen Sporen wurde an lebendem Material gemessen. Der Durchmesser beträgt durchschnittlich 4,5 μ; die extremen Werte waren 3,5 und 5,5 μ. Nach Halsted und Fairchild schwankt der Durchmesser der Sporen zwischen 5 und 9 μ, während Elliott die Sporengröße mit 2,5—3,5 : 3—5 μ angibt.

4. Vergleich mit den bisherigen zytologischen Untersuchungen an *Ceratostomella fimbriata*.

Da die vorliegende zytologische Untersuchung grundlegende Abweichungen von Elliotts Ergebnissen erbrachte, war zunächst zu vermuten, daß die von mir untersuchte Art nicht mit Elliotts *Ceratostomella fimbriata* identisch ist. Leider konnte ein Vergleich des Pilzes mit lebendem Material von Elliotts Pilz nicht vorgenommen werden. Da Elliott aber erwähnt, daß Myzel und Konidien seiner *C. fimbriata* von Halsted und Fairchild (1891) für *Ceratocystis fimbriata* (Ell. und Hals.) beschrieben werden und die Beschreibung keiner Ergänzung bedarf, wurde eine Nachbestimmung an Hand dieser ausführlichen Beschreibung unternommen, wobei sich vollständige Übereinstimmung der beiden Formen ergab.

Bei einem näheren Vergleich der beiden Untersuchungen zeigt sich, daß das von Elliott beschriebene Ascogon mit Trichogyne nichts anderes sein kann als die Endzelle der oben beschriebenen Ascogonspirale. Da diese Endzelle an der Spitze stets weiterwächst, ist sie meist länger als die übrigen Zellen der jungen Peritheziumanlage, und so wurde ihr Ende anscheinend als Trichogyne angesehen. Übereinstimmend mit Elliott konnte ich in dieser Zelle sehr häufig zwei Kerne auffinden; doch ließ sich feststellen, daß diese Kerne nicht wie nach Elliotts Deutung einen männlichen und weiblichen Kern darstellen, sondern daß beide durch Teilung aus dem Kern dieser terminalen Zelle hervorgegangen sind. Elliott will alle Stadien im Abwärtswandern des männlichen Kernes durch die Trichogyne gefunden haben; tatsächlich aber stellen diese Bilder das Auseinanderweichen der beiden Tochterkerne dar. Eine Vereinigung von zwei Kernen im Ascogon konnte dementsprechend auch nicht aufgefunden werden, so daß sich das Vorhandensein einer doppelten Befruchtung bei *Ceratostomella fimbriata* nicht bewahrheitete.

Ceratostomella fimbriata weist somit Ähnlichkeit auf mit der von Sartoris untersuchten *C. adiposa*. Bei dieser Art wurde ebenfalls kein Antheridium aufgefunden, und die ascogenen Hyphen nehmen ihre Entstehung aus einer plasmareichen Hyphe. Nähere Übereinstimmungen in der Ausbildung und Entwicklung des Ascogons lassen sich jedoch nicht feststellen, da die entsprechenden Angaben hierüber für *C. adiposa* fehlen.

B. *Ceratostomella coerulea* Mch.

1. Material.

Ceratostomella coerulea erhielt ich ebenfalls in Reinkultur aus dem mykologischen Institut in Baarn. Der Pilz wurde auf 5proz. Malzextraktagar kultiviert, auf dem er sehr rasch und üppig Perithezien zur Entwicklung brachte; etwa 15—20 Tage nach dem Impfen enthielten die Kulturen stets reife Fruchtkörper.

2. Einsporkulturen.

Da Münch in seinen Einsporkulturen Perithezienanfänge beobachtet hatte, war zu vermuten, daß auch diese Art homothallisch ist. Es wurden jedoch zur sicheren Feststellung 10 Kulturen aus je einer Konidie hergestellt, und hierbei zeigte sich, daß diese Kulturen nicht zur Perithezienbildung befähigt sind. Auf dieses Resultat hin wurden Kulturen aus je einer Ascusspore erzogen, und nach der bei *C. fimbriata* beschriebenen Methode 140 Einsporkulturen gewonnen.

Diese Einsporstämme wiesen in den ersten Tagen ihres Wachstums keine Verschiedenheit von den normalen Kulturen auf. Sie bildeten rasch und reichlich ein weißes Myzel und ließen nach 5—6 Tagen die Peritheziumanlagen als kleine braune Kugeln erkennen. Während in den gewöhnlichen Kulturen nach 2—3 Wochen reife Perithezien zu beobachten sind, brachten die Einsporstämme selbst nach mehreren Wochen keine Fruchtkörper zur Reife. Die beobachteten jungen Perithezien entwickelten sich viel langsamer und stellten schließlich ihr Wachstum in einem Stadium, in dem der Hals angelegt werden sollte, ein. Bisweilen wurden jedoch auch Fruchtkörper mit Hälsen ausgebildet, doch weist der Hals eines solchen Einsporperitheziums geringere Länge auf und zeigt meist Knickungen oder Windungen. Auf jeden Fall fehlt stets

der Sporentropfen auf seiner Mündung. Mikrotomschnitte durch solche Einsporperithezien zeigten, daß das Innere leer oder von plasmaarmen Zellen erfüllt ist, jedoch nie Sporen enthält. Die Größe dieser sterilen Perithezien ist sehr verschieden. Sie beträgt im Durchschnitt ein Viertel bis ein Drittel der fertilen Perithezien, kann jedoch in Ausnahmefällen bis fast an die normale Peritheziumgröße heranreichen. Durch Überimpfen von Konidien oder Myzel wurden sämtliche Einsporstämme 12—16 Monate lang in Kultur gehalten, und während dieser Zeit trat in keinem der Stämme normale Peritheziumbildung ein.

Die Einsporkulturen unterscheiden sich von den Mischkulturen meist durch die hellere Färbung ihres Myzels. Solange sich in den gewöhnlichen Kulturen die Perithezien entwickeln, färbt sich das anfangs weiße Myzel dunkel. Das im Substrat verlaufende Myzel wird schwarz, während sich das Luftmyzel grau färbt. In den Einsporkulturen dagegen tritt die Dunkelfärbung der tieferen Myzelschichten meist langsamer ein, und das Luftmyzel behält mehrere Wochen seine helle, oft rein weiße Färbung bei. Ein geringer Unterschied zwischen gewöhnlichen und Einsporkulturen läßt sich auch in der Wuchsform des Myzels erkennen. In den Perithezienkulturen entwickelt sich das Luftmyzel reichlicher und ragt in Form von Myzelzotten empor, während in den Einsporkulturen im allgemeinen ein mehr ebener Rasen gebildet wird. Wenn die Einsporkulturen später ebenfalls eine dunkle Färbung annehmen, so wird diese durch die Schwarzfärbung der tieferen Myzelschichten verursacht, die unter dem spärlicher entwickelten Luftmyzel zum Vorschein kommen. Ganz scharf sind diese Unterschiede nicht in jedem einzelnen Fall festzustellen, doch sind sie bei der Beobachtung einer größeren Anzahl von Kulturen stets zu erkennen.

Da die einzeln kultivierten Einsporstämme nicht zur Ascussporenbildung befähigt sind, wurden die Stämme paarweise zusammengebracht, und hierbei konnte in bestimmten Kombinationen in der Berührungszone Perithezienbildung erzielt werden. Um die Stämme auf ihr gegenseitiges Verhalten zu untersuchen, wurden zahlreiche Kombinationen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden einzelne Serien von 6—12 Kulturen herausgegriffen und hiervon alle Kombinationen hergestellt. In Tabelle 1—4 sind die Ergebnisse von vier solchen Serien zur Darstellung gebracht. Das Auftreten einer Peritheziumlinie ist mit +, ihr Ausbleiben mit —

bezeichnet. Die Tabellen 1 und 2 zeigen das Versuchsergebnis zweier Serien fortlaufend numerierter Kulturen. Die Stämme sind bereits in der üblichen Weise nach ihrem Verhalten geordnet. In Tabelle 3 und 4 sind zwei weitere Serien dargestellt.

Tabelle 1—4.

Ceratostomella coerulea. Verhalten einer Anzahl Einsporkulturen bei gegenseitiger Kombination.

Tabelle 1.

Einsporkulturen 50—56.

	50	53	54	55	51	52	56
50	—	—	—	—	+	+	+
53	—	—	—	—	+	+	+
54	—	—	—	—	+	+	+
55	—	—	—	—	+	+	+
51	+	+	+	+	—	—	—
52	+	+	+	+	—	—	—
56	+	+	+	+	—	—	—

Tabelle 2.

Einsporkulturen 57—65.

	60	63	64	57	58	59	61	62	65
60	—	—	—	+	+	+	+	+	+
63	—	—	—	+	+	+	+	+	+
64	—	—	—	+	+	+	+	+	+
57	+	+	+	—	—	—	—	—	—
58	+	+	+	—	—	—	—	—	—
59	+	+	+	—	—	—	—	—	—
61	+	+	+	—	—	—	—	—	—
62	+	+	+	—	—	—	—	—	—
65	+	+	+	—	—	—	—	—	—

Tabelle 3.

Einsporkulturen 75—83.

	75	81	83	76	77	78	79	80	82
75	—	—	—	+	+	+	+	+	+
81	—	—	—	+	+	+	+	+	+
83	—	—	—	+	+	+	+	+	+
76	+	+	+	—	—	—	—	—	—
77	+	+	+	—	—	—	—	—	—
78	+	+	+	—	—	—	—	—	—
79	+	+	+	—	—	—	—	—	—
80	+	+	+	—	—	—	—	—	—
82	+	+	+	—	—	—	—	—	—

Tabelle 4.

Einsporkulturen 84—93.

	84	85	87	89	91	92	93	86	88	90
84	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
85	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
87	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
89	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
91	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
92	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
93	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
86	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
88	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
96	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—

Es läßt sich aus den Tabellen ersehen, daß sich die Einsporstämme scharf in zwei Gruppen trennen lassen. Jeder Stamm der einen Gruppe reagiert mit jedem Stamm der anderen unter Perithezienbildung, während die Stämme innerhalb einer Gruppe untereinander steril sind. *Ceratostomella coerulea* ist somit als heterothallische Form zu bezeichnen.

Von 100 fortlaufend numerierten Einsporstämmen (90 Stämme aus je einer Ascusspore und 10 Stämme aus je einer Konidie) gehörten 48 Stämme (44 aus Ascussporen und 4 aus Konidien) der einen und 52 Stämme (46 aus Ascussporen und 6 aus Konidien) der anderen Gruppe an. Wegen der Hinfälligkeit der Ascuswände war es nicht möglich, die Sporen eines einzelnen Ascus zu isolieren, um danach die Verteilung der beiden Gruppen im Ascus festzustellen.

Häufig ließ sich in der Berührungszone zwischen dem Myzel der einen und dem der anderen Gruppe ein aus Luftmyzel gebildeter Wulst erkennen. Diese Erhebung kommt jedoch nicht dadurch zustande, daß in der Kreuzungszone beider Stämme zwei Schichten Myzel vorhanden sind; denn zwischen zwei Myzelien ein und derselben Gruppe tritt kein solcher Wulst auf. Es wirkt somit anscheinend das Myzel der einen Gruppe wachstumsfördernd auf das der anderen. Eine üppige solche Wulstbildung konnte zwischen rasch wachsenden Kulturen beobachtet werden. Bei Myzelien, die infolge von Nährstoffmangel oder Trockenheit nur langsames Wachstum zeigten und in der Berührungszone spärlich Perithezien bildeten, konnte sie dagegen völlig ausbleiben.

Eine ähnliche Erscheinung erwähnt Dade bei seiner heterothallischen *Ceratostomella parasitica*. Bei dieser Art tritt in der Berührungszone zweier Stämme von verschieden geschlechtlicher Tendenz Dunkelfärbung ein, die auf vermehrter Bildung von Makrokonidien beruht. Wenn dagegen zwei gleichartige Stämme zusammentreffen, tritt nur eine leichte Steigerung in der Bildung von Mikrokonidien ein.

Um die Frage zu untersuchen, ob zwischen beiden Stämmen irgendwelche morphologischen Unterschiede bestehen und etwa der eine Stamm als weiblicher, der andere als männlicher zu erkennen ist, wurden Kulturen verschiedener Einsporstämme in der feuchten Kammer beobachtet. Die Konidien entwickeln ein Myzel, das in den beiden Gruppen nicht den geringsten Unterschied aufweist. Etwa 36 Stunden nach dem Aussäen der Konidien sind die ersten Peritheziumanlagen zu beobachten, und auch diese lassen keine Unterschiede wahrnehmen. Die Anlage beginnt mit einem kurzen spiraligen Hyphenende, das im Gegensatz zu der bei *C. fimbriata* beobachteten Spirale aus einer einzigen Zelle besteht. Diese kann, solange sie zwischen den später erscheinenden Hüllhyphen zu erkennen ist, bis zu vier oder fünf Windungen

aufweisen. Gebilde, die als Antheridien zu deuten wären, wurden in den Einsporkulturen nicht aufgefunden. Die Perithezienanlagen entwickelten sich langsam zu braunen Kugeln weiter, während gewöhnliche Kulturen unter denselben Bedingungen reife Perithezien hervorbrachten.

3. Peritheziumanlage.

Das Verhalten der Einsporkulturen ließ zunächst einen Befruchtungsvorgang erwarten, und so wurde in den Mischkulturen in der feuchten Kammer nach einem Antheridium gesucht. Es konnte jedoch kein solches Organ aufgefunden werden. Als Peritheziumanlage wurde wie in den Einsporkulturen nur die spiralige Zelle aufgefunden. Da bei *C. fimbriata* das Ascogon sich jedoch erst in einem späteren Stadium der Peritheziumentwicklung herausdifferenziert, wäre auch die Möglichkeit gegeben, daß Ascogon und Antheridium erst später ausgebildet werden und wegen der Unübersichtlichkeit der Hüllhyphen nicht zu erkennen sind. Die Untersuchungen wurden deshalb an geschnittenem und gefärbtem Material fortgesetzt.

Fixiert, geschnitten und gefärbt wurde nach der für *C. fimbriata* angegebenen Weise. Für die ersten Stadien der Perithezienbildung (Fig. 42—45) wurde das ganze in der feuchten Kammer erzogene Myzel mit samt dem umgebenden Nähragar fixiert, gefärbt und in Canadabalsam eingebettet. Die Zellen des vegetativen Myzels enthalten je einen Zellkern, der im jungen Myzel beträchtliche Größe aufweist (Fig. 43). Die Peritheziumanlage ist anfangs ebenfalls einkernig (Fig. 42); doch weist sie nach Ausbildung ihrer Windungen zwei bis vier, manchmal bis zu acht Kerne auf. Auch in Einspormyzelien zeigen die Peritheziumanlagen diese Ausbildung. Varitchak (1931) fand bei seinen zytologischen Untersuchungen an *Ceratostomella piceae*, daß die bei dieser Art zu Beginn der Peritheziumbildung auftretende spiralige Hyphe das junge Ascogon darstellt, da aus ihm später die ascogenen Hyphen entspringen. Die von Varitchak als Trophogon bezeichnete Zelle (s. oben S. 188) ist bei *C. coerulea* nicht vorhanden. Ich erhielt zwar häufig ähnliche Bilder wie die von Varitchak wiedergegebene Fig. 1, Taf. VIII. Ganz regelmäßig tritt nach dem Erscheinen der Spirale eine zweite Zelle auf, die auf die gebogenene oder gewundene Zelle zuwächst; doch entspringt diese zweite Zelle fast immer der Nachbar-

zelle der Spirale und in allen beobachteten Fällen demselben Myzelast. Eine besondere Funktion dieser Hyphe konnte nicht festgestellt werden. Sie beteiligt sich an der Umhüllung der spiraligen Anlage wie die später auftretenden Hyphen auch. Ein Verschwinden wie bei dem Trophogon von *C. piceae* war nicht zu beobachten, so daß wohl kein Grund vorliegt, dieser Hyphe eine besondere Bedeutung zuzuschreiben.

Fig. 42.

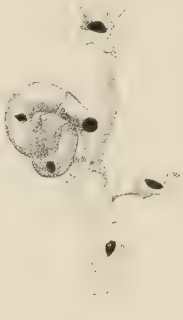

Fig. 43.

Fig. 44.

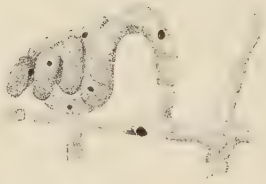

Fig. 45.

Fig. 42—45. Erste Anfänge der Peritheziumbildung bei *Ceratostomella coerulea*. Vergr. 1520×.

Auch die übrigen Hüllhyphen entspringen den der Spirale benachbarten Zellen desselben Myzelastes (Fig. 44 und 45) und bilden durch mehrfache Verzweigung bald eine dichte Hülle.

Während bei *C. fimbriata* die Zellen der Spirale stark anschwellen und die Kerne an Größe zunehmen, scheint die Spirale bei *C. coerulea* nur in die Länge zu wachsen. Die Kerne werden hierbei nicht größer, sondern nehmen im Gegenteil bei der fortschreitenden Entwicklung des Peritheziums an Größe ab. Das Innere eines jungen Fruchtkörpers zeigt deshalb langgestreckte schmale Zellen, die infolge ihres gewundenen Verlaufs in den Prä-

paraten mehrfach angeschnitten sind und sich deshalb schlecht verfolgen lassen. Es wurden ganz ähnliche Bilder erhalten wie die von Varitchak für *C. piceae* in seinen Fig. 6—10, Taf. VIII wiedergegebenen. Ein Antheridium konnte jedoch auch hier in diesen späteren Stadien nicht aufgefunden werden. Wegen der Kleinheit der Zellquerschnitte und der Kerne war auch die Bildung der ascogenen Hyphen und Asci nicht zu verfolgen.

Aus den Untersuchungen an *Ceratostomella pluriannulata* (Gregor, 1932) und *C. coerulea* geht hervor, daß beide Arten weitgehende Übereinstimmung in ihrem Verhalten zeigen. Sie sind beide heterothallisch, und ihre Einsporstämme bilden sterile Perithezien aus. Wie bei *C. pluriannulata* konnte auch bei *C. coerulea* weder ein Antheridium noch irgendwelcher Befruchtungsvorgang zu Beginn der Peritheziumbildung aufgefunden werden. Auch morphologisch zeigen die beiden Arten große Übereinstimmung (s. Münch 1907 und Lagerberg, Lundberg und Melin, 1927). Ich erhielt im Mai dieses Jahres aus dem Zentralbureau für Pilzkulturen in Baarn die Stämme des von Gregor untersuchten Pilzes und konnte mich selbst von der Ähnlichkeit beider Arten überzeugen.

4. Heterothallie bei Pyrenomyzeten.

Die Mehrzahl der Pyrenomyzeten scheint homothallisch zu sein, wie die bisherigen Untersuchungen zeigen. So wurden Perithezien in Einspormyzel erhalten bei *Sordaria fimicola* Ces. und de Not. (Piehl, 1929), *Ophiobolus graminis* Sacc. (Davis, 1925), *Diaporthe perniciosa* Marchal (Cayley, 1923), *D. galericulata* (Tul.) Sacc. (Wehmeyer, 1926), *Mycosphaerella pinodes* Stone (Vaughan, 1916) usw.

Heterothallie dagegen konnte einwandfrei erst für einige wenige Pyrenomyzeten festgestellt werden (eine Zusammenstellung findet sich bei Kniep, 1928, S. 370—373). Vor allem sind hier die Untersuchungen von Shear und Dodge (1927) an verschiedenen *Neurospora*-Arten zu erwähnen. Die Einsporstämme von *Neurospora sitophila* und *N. crassa* bringen nur Konidien und bisweilen sklerotienartige Gebilde, nie jedoch Perithezien zur Ausbildung. Wenn dagegen zwei bestimmte Einsporstämme kombiniert wurden, traten in den Kulturen Perithezien auf. Die Stämme konnten auf Grund dieses Verhaltens in zwei Gruppen getrennt werden, die einzeln kultiviert steril sind, beim Zusammentreffen aber Perithezien

entwickeln. Bei *N. crassa* gelang es überdies in einigen Fällen, die acht Sporen eines Ascus zu isolieren, und diese ergaben je vier Myzelien der einen und vier Myzelien der anderen Gruppe. Außerdem wurde von Shear und Dodge *N. tetrasperma*, eine Art mit viersporigen Asci, untersucht. Die Sporen dieser Art zeigen verschiedene Größe, und bei Kulturversuchen mit Einsporstämmen stellte sich heraus, daß das Myzel aus normalen und großen Sporen Perithezien zur Entwicklung bringt, während das Myzel aus kleinen Sporen steril ist und erst in bestimmten Kombinationen Fruchtkörper bildet. Die Einsporkulturen aus den kleinen Sporen gehören wie die der beiden anderen Arten zwei verschiedenen Gruppen an. *Neurospora tetrasperma* ist also normalerweise homothallisch, kann jedoch auch heterothallisch sein, wenn das Myzel aus kleinen Sporen stammt[1]).

Ein ähnliches Verhalten zeigt auch *Pleurage anserina* (Ces.) Kuntze (Dowding, 1931), eine Art mit ebenfalls viersporigen Asci. Bisweilen treten in einem Ascus zwei kleinere Sporen anstelle einer normalen auf. Während die Myzelien einzelner normaler Sporen Perithezien ausbilden, sind die Einsporstämme aus kleinen Sporen steril und bringen erst in bestimmten Kombinationen Fruchtkörper zur Entwicklung. In einem Paar kleiner Sporen gehört stets eine Spore dem einen (+) Geschlecht, die andere dem entgegengesetzten (—) Geschlecht an.

Die in den Einsporkulturen von *Neurospora sitophila* auftretenden sklerotienartigen Gebilde wurden von Shear und Dodge nicht näher auf ihre Entstehung und Bedeutung hin untersucht. Sie treten bisweilen auch in dem Fungus imperfectus *Monilia sitophila* auf (z. B. Went, 1901), für den Shear und Dodge an Hand von Kulturversuchen zeigen konnten, daß er stets einen der beiden Stämme von *Neurospora sitophila* darstellt. Diese sklerotienartigen Gebilde einer *Monilia*-Art nun wurden von Moruzi (1930) untersucht, und als Anlage eine typische Ascogonspirale mit Trichogyne gefunden. Diese Körper dürften deshalb unentwickelte Perithezien darstellen. Zytologisch wurden die drei *Neurospora*-Arten von Moreau (1930) untersucht, und hierbei konnte beim Beginn der Perithezienbildung kein Befruchtungsvorgang festgestellt werden. M. und Mme. Moreau gelangten daher zu der Vermutung, daß vor der Perithezienbildung durch Anastomosen zwischen den Myzelien der beiden Gruppen ein gemischtgeschlechtliches Myzel zustandekommt, das zur Perithezienbildung befähigt ist.

1) Vgl. hierzu auch Dodge (1927) und Wilcox (1928).

C. *Ceratostomella quercus* Georgevitch.

1. Material.

Dieser Pilz stammt aus einem Eichenbestand des Forstamtes Altheim in der Schwäbischen Alb. Die Eichen dieses Forstbezirkes zeigen seit 20—30 Jahren schwere Schädigungen durch krebsartige Beulen und Wunden. Auf Veranlassung von Herrn Professor Dr. Lehmann wurde eine Anzahl dieser Bäume in den Jahren 1912—14 im hiesigen Institut einer näheren Untersuchung unterzogen. Hierbei wurde ein Pilz aufgefunden, der damals von Saccardo als in die Verwandtschaft von *Ceratostomella dryina* gehörend bestimmt wurde. Die Perithezien dieses Pilzes wurden auch am lebenden Baum auf den Krebswunden beobachtet und konnten aus dem Holz der erkrankten Bäume in Reinkultur erzogen werden. Ob aber diese *Ceratostomella*-Art der Erreger der Krankheit ist, konnte bis heute nicht mit Sicherheit festgestellt werden (Lehmann, 1932).

Im Juni 1931 wurde im selben Revier eine erkrankte Eiche gefällt, um den Pilz wieder in Kultur zu nehmen. Von der Grenze des gebräunten kranken zum gesunden Holz wurden kleine Späne möglichst steril entnommen und in Kulturgefäßen feucht gehalten. Nach einigen Tagen bis Wochen traten auf dem Holz die Graphien und Perithezien des Pilzes auf. Durch Übertragen von reinen Ascussporen und Graphiumkonidien auf sterile Nährböden konnte ich leicht Reinkulturen gewinnen. Eine Kultur des Pilzes wurde hierauf dem Zentralbureau für Pilzkulturen in Baarn zugesandt, wo die Bestimmung ergab, daß der Pilz mit der 1926 und 1927 von Georgevitch beschriebenen *Ceratostomella quercus* übereinstimmt.

Der Pilz wurde auf 5 proz. Malzextraktagar kultiviert, auf dem er üppiges Wachstum zeigte. Georgevitch fand, daß sich lange Zeit hindurch aus den Ascussporen nur die Graphiumfruchtform entwickelt und erst nach 4—5 Wochen die Perithezien auftreten. Diese zeitliche Trennung im Erscheinen der Haupt- und Nebenfruchtform konnte ich jedoch nur selten beobachten. In Kulturen aus Ascussporen waren gewöhnlich schon wenige Tage nach dem Impfen die jungen Perithezien zu beobachten, die nach etwa 14 Tagen reife Ascussporen entleerten. Die Graphien brauchen zu ihrer Entwicklung nur 3—5 Tage und können deshalb bisweilen vor den

Perithezien erscheinen. In vielen Kulturen aus Ascussporen traten jedoch überhaupt keine Graphien, sondern nur Perithezien auf. Dagegen ließen sich die Graphien leicht erhalten, wenn die Kulturen aus Graphiumkonidien gewonnen wurden.

2. Einsporkulturen.

Von Georgevitch waren Kulturen aus reinen, jedoch nicht einzelnen Ascussporen hergestellt worden. Es stand also noch die Frage offen, ob bei *C. quercus* wie bei *C. coerulea* zwei Stämme zur Perithezienbildung erforderlich sind. Um diese Frage zu klären, wurden Kulturen aus einzelnen Ascussporen gewonnen und so 35 Einsporstämme erzogen. In 20 dieser Kulturen konnten nach 3 Wochen reife Perithezien in großer Zahl beobachtet werden. In den übrigen Kulturen war nur Myzel vorhanden. Nach einmaligem Überimpfen auf frische Nährböden bildeten sich jedoch auch in diesen scheinbar sterilen Kulturen Perithezien. Mehrere der Einsporstämme wurden durch Überimpfen von Ascussporen weiter kultiviert, wobei stets wieder Perithezien erhalten wurden. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß *Ceratostomella quercus* homothallisch ist.

Das Auftreten der Perithezien ist somit auch ermöglicht, wenn das Myzel aus einer einzelnen Spore stammt. Die Perithezien wurden auch, im Gegensatz zu denen der obenerwähnten heterothallischen *C. ulmi*, im Freien beobachtet. Georgevitch fand sie in den peripheren Gefäßen des befallenen Baumes, und bei dem Vorkommen in der schwäbischen Alb waren sie auf den Krebswunden der Eichen vorhanden. Das verschiedene Verhalten der beiden Arten im Auftreten der Perithezienform findet somit wohl zum Teil darin eine Erklärung, daß *C. ulmi* heterothallisch, *C. quercus* aber homothallisch ist.

Für zytologische Untersuchungen ist der Pilz völlig ungeeignet, da die Zellen sehr schmal und die Kerne außerordentlich klein sind. Die allerersten Anfänge der Perithezienbildung konnten weder in der feuchten Kammer noch an geschnittenem und gefärbtem Material erkannt werden. Das jüngste Stadium, das sich als Peritheziumanlage zu erkennen gab, ist ein Hyphenknäuel, der im Innern aus plasmareichen Zellen besteht. Einzelheiten waren jedoch nicht festzustellen. Ebenso war es unmöglich, die Entstehung der ascogenen Hyphen und der Asci zu verfolgen.

Abschnitt III.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Bei der Ausführung von Kulturversuchen und zytologischen Untersuchungen an *Ceratostomella fimbriata* (E. und H.) Elliott, *C. coerulea* Münch und *C. quercus* Georgevitch wurden folgende Tatsachen festgestellt:

Ceratostomella fimbriata (E. und H.) Elliot und *Ceratostomella quercus* Georgevitch sind homothallisch. Die Einsporstämme dieser Arten zeigen auch nach mehreren, aus Ascussporen gewonnenen Generationen kein Nachlassen in der Perithezienbildung.

Ceratostomella coerulea Münch ist heterothallisch. Es sind zwei Gruppen von Einsporstämmen vorhanden. In den isoliert kultivierten Einsporstämmen gelangen Peritheziumanlagen zur Ausbildung, die sich zu kleinen, sterilen, meist halslosen Perithezien entwickeln. Bei Kombination von Kulturen der beiden Gruppen werden normale Perithezien gebildet.

Die Einsporstämme von *C. coerulea* zeigen keine morphologischen Unterschiede.

Die Anlage der sterilen sowie der fertilen Perithezien von *C. coerulea* stellt einen kurzen spiraligen Ast dar, der aus einer einzigen mehrkernigen Zelle besteht. Ein Antheridium konnte nicht festgestellt werden.

Bei der Anlage des Peritheziums von *Ceratostomella fimbriata* wird eine spiralige Hyphe ausgebildet, die aus mehreren einkernigen Zellen besteht. Ein Antheridium tritt bei *C. fimbriata* nicht auf, und eine Befruchtung findet bei Beginn der Peritheziumentwicklung nicht statt. Eine der mittleren Zellen der Spirale wird zum Ascogon, das mehrere, meist acht Kerne aufweist.

Aus dem Ascogon gehen nach Kern- und Zellteilungen einige mehrkernige Zellen hervor, die durch weitere Teilungen die ascogenen Zellen zur Ausbildung bringen. Diese sind kurz und enthalten meist zwei Kerne.

Bei der Ascusbildung schwillt eine paarkernige ascogene Zelle an, worauf sich ihre beiden Kerne vereinigen.

Während der ersten Kernteilung im Ascus treten Teilungsbilder auf, die im übrigen Entwicklungsgang des Pilzes nicht beobachtet wurden.

Nach der zweiten Kernteilung trennt sich eine periphere Zone des jungen Ascus los. In der inneren Zone erfolgt die dritte Kernteilung.

Vorliegende Untersuchungen wurden vom Frühjahr 1930 bis Frühjahr 1932 im Botanischen Institut Tübingen ausgeführt. Für die Anregung zu dieser Arbeit, das stete Interesse und die Unterstützung während ihrer Ausführung spreche ich Herrn Professor Dr. E. Lehmann meinen herzlichsten Dank aus. Weiterhin bin ich Herrn Dr. R. Beatus für zahlreiche wertvolle Ratschläge zu besonderem Dank verpflichtet.

Tübingen, im Juli 1932.

Literaturverzeichnis.

Buismann, Christine, 1932, *Ceratostomella ulmi* de geslachtelijke vorm van *Graphium ulmi* Schwarz. Tijdschrift over Plantenziekten, Bd. 38, S. 1.

Butler, E. J., 1906, Fungus diseases of Sugar-cane in Bengal. Mem. of the Depart. of Agricult. in India. Bot. Ser., Bd. 1, Heft 3, S. 35.

Cayley, Dorothy, M., 1923, The phenomenon of mutual aversion between mono-spore mycelia of the same fungus (*Diaporthe perniciosa*, Marchal). With a discussion of sex-heterothallism in fungi. Journ. of Genetics, Bd. 13, S. 353.

Dade, H. A., 1928, *Ceratostomella parasitica*, the perfect stage of *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) von Höhnel. Transact. of the Brit. mycol. Soc., Bd. 13, S. 184.

Davis, Ray, J., 1925, Studies on *Ophiobolus graminis* Sacc. and take-all disease of wheat. Journ. of Agric. research, Bd. 31, S. 801.

Dodge, B. O., 1927, N clear phenomena associated with heterothallism and homothallism in the Ascomycete *Neurospora*. Journ. of Agricult. Research, Bd. 35, S. 289.

Dowding, Silver, S., 1931, The sexuality of the normal giant, and dwarf spores of *Pleurage anserina* (Ces.), Kuntze. Ann. of Bot., Bd. 45, S. 1.

Edgerton, C. W., 1914, Plus and minus strains in the genus *Glomerella*. Amer. Journ. of Bot., Bd. 1, S. 244.

Elliott, John, J., 1923, The ascigerous stage of the sweet potato black-rot fungus (Abstract). Phythopathology. Bd 13, S. 56.

— —, 1925, A cytological study of *Ceratostomella fimbriata* (E. und H.) Elliott. Phytopathology, Bd. 15, S. 417.

Frey, Charles, N., 1924, The cytology and physiology of *Venturia inequalis* (Cooke) Winter. Transact. of the Wisconsin Academy, Bd. 21, S. 303.

Georgevitch, P., 1926, *Ceratostomella Querci* n. sp. Comptes rendus hebd. des Séances de l'Acad. des Sciences, Bd. 183, S. 759.

— —, 1927, *Ceratostomella quercus*, n. sp. Ein Parasit der slawonischen Eichen. Biologia generalis III, 3, S. 245.

— —, 1930, *Ceratostomella merolinensis* n. sp. Mitt. aus dem Inst. f. forstw. Forsch. (kroatisch mit deutscher Zusammenfassung). Belgrad 1930.

Gregor, Mary, 1932, A study of heterothallism in *Ceratostomella pluriannulata* Hedgcock. Annales Mycologici, Bd. 30, S. 1.

Halsted, B. D. und Fairchild, D. G., 1891, Sweet potato black rot. Journ. of Mycology, Bd. 7, S. 1.

Hedgcock, G. G., 1906, Studies upon some chromgenic fungi which discolour wood. Ann. rep. of the Missouri Bot. Garden.

Killian, K., 1917, Über die Sexualität von *Venturia inaequalis* (Cooke) Ad. Zeitschr. f. Botanik, Bd. 9, S. 353.

— —, 1919, Sur la sexualité de l'Ergot de Seigle, le *Claviceps purpurea* (Tulasne). Bull. Soc. mycol. de France, Bd. 35, S. 182.

— —, 1922, Le développement du *Stigmatea Robertiani* Fr. Rév. gén. de Bot., Bd. 34, S. 577.

Kniep, H., 1928, Die Sexualität der niederen Pflanzen.

Lagerberg, T., Lundberg, G., and Melin, E., 1927, Biological and practical researches into blueing in pine and spruce. Svenska Skogsvardsför. Tidskrift, Bd. 25, S. 145.

Lehmann, E., 1932, *Ceratostomella quercus* Georgevitch in der Schwäbischen Alb. Zentralbl. f. Bakt.- u. Infektionskrankheiten II, Bd. 86, S. 40..

Likhité, V., 1926, Recherches sur le développement et la biologie de quelques Ascomycètes. Rev. gén. de Bot., Bd. 38, S. 4.

Loos, W., 1932, Über eine buchenbewohnende *Ceratostomella*, *Ceratostomella fagi* nov. sp. Arch. f. Mikrobiologie, Bd. 3, S. 370.

Moreau, F., M. et Mme., 1930, Le Développement du Périthèce chez quelques Ascomycètes. Rev. gén. de Bot., Bd. 42, S. 65.

Moruzi, Constance, 1930, Sur une maladie du Champignon de couche causée par un Monilia. Bull. trimestr. de la Soc. Mycol. de France, Bd. 46, S. 143.

Münch, E., 1907, Die Blaufäule des Nadelholzes. Naturw. Zeitschr. f. Land- u. Forstwirtschaft, Bd. 5, S. 531.

Piehl, Addie, E., 1929, The cytology and morphology of *Sordaria fimicola* Ces. and de Not. Transact. of the Wisconsin Acad., Bd. 24, S. 323.

Rumbold, Caroline, 1930, The relationship between the bluestaining *Fungi Ceratostomella* and *Graphium*. Mycologia, Bd. 22, S. 175.

Sartoris, G. B., 1927, A cytological Study of *Ceratostomella adiposum* (Butl.) comb. nov., the black-rot fungus of Sugar-cane. Journ. of Agricult. Research, Bd. 35, S. 577.

v. Schrenk, H., 1903, The blueing and the red rot of the yellow western pine. Bull. 36. Un. States Depart. of Agric. Bur. of Plant Industr.

Shear, C. L. und Dodge, B. O., 1927, Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. Journ. of Agricult. Res., Bd. 34, S. 1019.

Varitchak, B., 1931, Contribution à l'étude du développement des Ascomycètes. Le Botaniste, Sér. 23, S. 1.

Vaughan, R. E., 1916, The development of *Mycosphaerella pinodes* in pure culture. Phytopathology, Bd. 6, S. 103.

Wehmeyer, L. E., 1926, Further cultural life histories of the stromatic Sphaeriales. Amer. Journ. of Bot., Bd. 13, S. 231.

Went, F. A. F. C., 1901, Monilia sitophila (Mont.) Sacc. ein techn. Pilz Javas. Centralblatt f. Bakteriologie. 2. Abteilung, Bd. 7, S. 544.

Wilcox, Marguerite, 1928, The sexuality and arrangement of the spores in the ascus of *Neurospora sitophila*. Mycologia, Bd. 20, S. 3.

Lebenslauf

Am 20. Dezember 1908 wurde ich als Tochter des Weinbauinspektors Ludwig Mittmann und seiner Ehefrau Anna geb. Gohl in Offenau O.-A. Neckarsulm geboren. Von 1915 bis 1919 besuchte ich die evangelische Volksschule in Jagstfeld, von 1919 bis 1924 die Realschule in Wimpfen und anschließend die Oberrealschule in Heilbronn, die ich im Frühjahr 1927 mit der Reifeprüfung verließ. Zum Studium der Naturwissenschaften war ich von Frühjahr 1927 bis Ostern 1929 an der Technischen Hochschule in Stuttgart und von Ostern 1929 bis Wintersemester 1932 an der Universität Tübingen immatrikuliert.